

令和 元年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16085

研究課題名(和文) ファブリー病治療における活性型 ビタミンDの可能性～オートファジーの観点から～

研究課題名(英文) Potential effect of active vitamin D analogue as an adjuvant therapy for Fabry disease: from the point of autophagy

研究代表者

難波 倫子 (Namba, Tomoko)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：30734420

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：有症状ファブリーモデルマウスを作製し、腎障害の発現を蛋白尿および病理組織像で確認を行った。電子顕微鏡ではZebra体の蓄積は糸球体より尿細管細胞に多くみられた。また、このマウスは野生型に比して、尿細管マーカーであるメガリンの染色性の低下と遺伝子レベルでの発現の低下を認めた。ファブリーモデルマウスに酵素補充+活性型ビタミンD投与の検討を行い、尿蛋白の減少効果を確認した。腎障害が軽微であるため、治療効果の検討には長期間での観察が必要と考え、現在観察期間を延長した検討を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

活性型ビタミンDはZebra bodyの蓄積により障害された尿細管のリソソームの機能を改善することにより、たんぱく尿を減少する可能性がある。その機序として、メガリン、キュビリンといった冊子縁に発現している膜蛋白の関与が示唆された。今後は、確立したモデルから培養尿細管細胞を樹立し、この培養細胞を用いて、活性型ビタミンDがファブリー病において作用するメカニズムを解明していく。これらの結果より、ファブリー病の腎障害改善薬として活性型ビタミンD製剤が臨床的に応用される可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We generated symptomatic Fabry disease mice (Fabry mice) with proteinuria and histological alterations. On electron microscopy, more accumulation of lamellated lipid inclusions called zebra bodies were observed in tubular epithelial cells than in podocytes. Fabry mice showed lower expression of megalin in proximal tubular cells, compared to control mice. We confirmed that administration of active vitamin D with enzyme decreased proteinuria of Fabry mice. Renal manifestations of 7-month-old Fabry mice were so weak that we need longer observational period to evaluate treatment effects of active vitamin D.

研究分野：腎臓内科

キーワード：ファブリー病 活性型ビタミンD リソソーム TFEB

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ファブリー病は α -ガラクトシダーゼ (GLA) 遺伝子の変異によって生じるリソソーム蓄積症である。腎臓は心臓、脳血管とともにファブリー病の重要な標的臓器である。ファブリー病では GLA の基質であるグロボトリアオシルセラミド (Gb3) などの糖脂質がリソソーム内に蓄積する。リソソームは細胞内外の物質の分解を担うオルガネラであるが、リソソームに分解すべき細胞質成分 (不要なタンパク質やオルガネラ) を運ぶ機構がオートファジーである。オートファジーはリソソームと協調することで細胞内の分解機構としての役割を果たす。そのため、リソソームに異常をもつリソソーム蓄積病では、オートファジーに多大な影響を及ぼすことは想像に難くない。一方で、酵素補充療法は唯一のファブリー病の治療法であるが、治療開始時にすでに腎機能の低下や蛋白尿を認める腎症の進行期ではその効果が不十分であると報告されている (Banikazemi, M., et al. *Annals of Internal Medicine*. 2007)。成人になって診断に至る例は蛋白尿が契機となることが多く、新たな治療オプションを探索する必要がある。

2. 研究の目的

ここで申請者らは、活性型ビタミン D が mTOR 抑制を介してオートファジーを誘導するという作用 (Loewith R., et al. *Mol Cell* 2002, Wang J., et al. *J Biol Chem* 2008) に着目し、活性型ビタミン D がファブリー病治療に応用することを着想した。本研究では、ファブリー病の病態におけるオートファジーの関与を明らかにするとともに、活性型ビタミン D を用いた新規治療オプションの可能性について探索することを目的とする。

3. 研究の方法

申請者らは GLA がノックアウトされたマウス (GLA KO) とヒトの Gb3 合成酵素を過剰発現させたマウス (G3S Tg) を交配して作成した有症状のモデルマウス (ファブリー病マウス) をすでに樹立している。このファブリー病マウスを GFP-LC3 トランスジェニックマウス (オートファゴソームが可視化できる) と交配することで、生体レベルでオートファジー活性の評価をすることが可能となる。オートファジー活性の評価については、申請者らが開発した *in vivo* でのオートファジーフラックスを評価する方法を用いる (Yamamoto T, et al. *Autophagy*. 2016)。活性型ビタミン D の腎保護効果の評価には、ファブリー病マウスに活性型ビタミン D を投与して、腎機能障害や蛋白尿が改善するにより評価を行う。

4. 研究成果

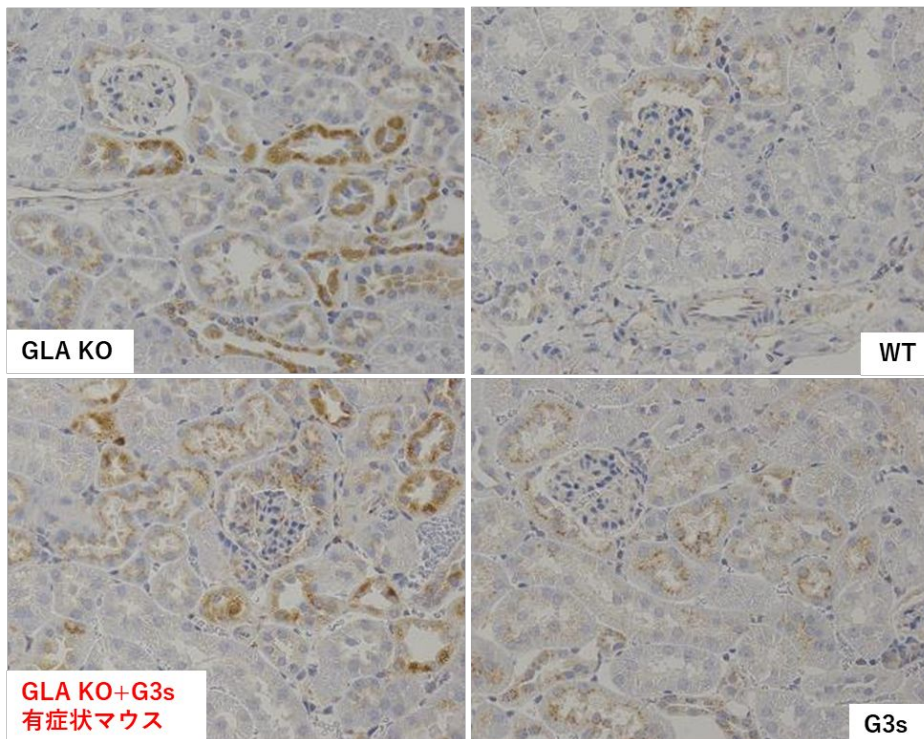
GLA KO と G3S Tg を交配した有症状ファブリーモデルマウスを作製し、25-30週齢で蛋白尿を呈することを確認した。顕微鏡上、拡張リソソームを糸球体および近位から遠位尿細管にかけて認めた (図1)。電顕においても Zebra body の蓄積は糸球体より尿細管に多く、ポドサイトの癒合は軽度であることを確認した。また、このマウスは野生型に比して、尿細管マーカーであるメガリンの染色性の低下と遺伝子レベルでの発現の低下を認めた。また、p62 染色によりオートファジー活性を検討した。ファブリーモデルマウスに酵素補充+活性型ビタミン D 投与の検討を行い、尿蛋白の減少効果を確認した。ただし 25-30週では腎障害が軽微であるため、治療効果の検討には長期間での観察が必要と考え、現在観察期間を延長した検討を進めている。

活性型ビタミン D は Zebra body の蓄積により障害された尿細管のリソソームの機能を改善することにより、たんぱく尿を減少する可能性がある。その機序として、メガリン、キュビリンといった冊子縁に発現している膜蛋白の関与が示唆された。また、リソソームの主要な制御因子である TFEB もファブリー病で変化していることを確認した。Fabry

病患者から取り出した皮膚線維芽細胞を用いて検討を行ったところ、Fabry病患者では核内でのTFEBの発現が低下している可能性が示唆された。また、活性型ビタミンDを野生型ヒト線維芽細胞に投与すると、TFEBの活性化を意味する核内移行が促進された(図2)。

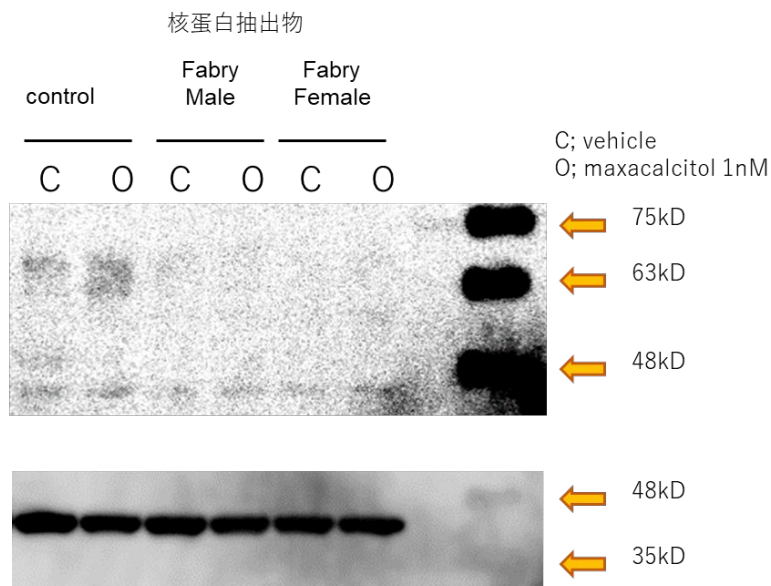
今後はこれら因子に着目して、ファブリー病における活性型ビタミンDの腎保護効果について検討を進めていく。具体的には、確立したモデルから培養尿細管細胞を樹立し、この培養細胞を用いて、活性型ビタミンDがファブリー病において作用するメカニズムを解明していく。これらの結果より、ファブリー病の腎障害改善薬として活性型ビタミンD製剤が臨床的に応用される可能性がある。

図1. Lamp1染色 ×400



有症状モデルマウスでは糸球体、近位～遠位尿細管に拡張リソソームを疑うLamp1強陽性像を観察する。

図2. Skin fibroblastにおけるTFEBの発現



5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

国内外の別：

取得状況 (計 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：猪阪 善隆、高島 義嗣、濱野 高行

ローマ字氏名：Isaka Yoshitaka, Takabatake Yoshiitsugu, Hamano Takayuki

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。